

10/525809 #2
Rec'd PCT/PTO 25 FEB 2005

PCT/JP 03/10681

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

25.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年12月27日

出願番号
Application Number: 特願 2002-382617
[ST. 10/C]: [JP 2002-382617]

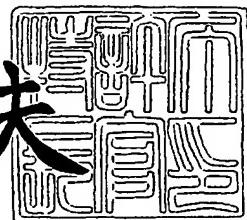
RECD 06 NOV 2003
PCT

出願人
Applicant(s): 財団法人大阪産業振興機構

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

2003年10月24日
今井康太



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 R7622

【提出日】 平成14年12月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07C239/14

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田西 2-8 A 9-310

【氏名】 佐々木 孝友

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府交野市私市 8-16-19

【氏名】 森 勇介

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府池田市石橋 1-21-18-232

【氏名】 吉村 政志

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市半町 2-15-41-C 205

【氏名】 安達 宏昭

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市津雲台 3-4-A 24-404

【氏名】 高野 和文

【特許出願人】

【識別番号】 801000061

【氏名又は名称】 財団法人大阪産業振興機構

【代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6135-6051

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高分子結晶の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 高分子結晶の製造方法であって、前記高分子溶液を入れた容器を運動させることにより前記高分子溶液を攪拌しながら前記高分子結晶を発生させ、これを成長させる製造方法。

【請求項 2】 前記運動が、回転、振動および揺動のいずれかの運動若しくはこれらを 2 種類以上組み合わせた運動である請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 3】 前記容器が、複数のウエルを有するウエルプレートであり、前記各ウエルに前記高分子溶液が入っている請求項 1 または 2 記載の製造方法。

【請求項 4】 前記高分子溶液中の溶媒を蒸発させる、または温度変化させることなどにより過飽和状態にする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 5】 前記容器に、前記高分子溶液よりも比重が重い液を入れ、前記比重が重い液と前記溶液との界面で結晶を成長させる請求項 1 から 4 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 6】 前記高分子以外の成分が前記高分子溶液より高濃度で溶解したリザーバー溶液を入れた別の容器を準備し、この容器と前記高分子を入れた容器とにおいて、水蒸気が移動可能な状態で、前記高分子結晶を発生・成長させる請求項 1 から 5 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 7】 高分子が、樹脂、タンパク質、糖類、脂質および核酸からなる群から選択される少なくとも一つである請求項 1 から 6 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 8】 請求項 1 から 7 のいずれかに記載の製造方法により得られた生体高分子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高分子結晶の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒトゲノム解読が終了しようとしている今日、バイオインフォマティックス（生命情報工学）などのプロテオームと呼ばれるポストゲノム研究が盛んになってきている。その中で、特に注目されるのが構造ゲノム科学と呼ばれるタンパク質の3次元構造を解き明かそうとする研究である。生体内で実際に様々な動きを司るのは遺伝子ではなく、遺伝子からできるタンパク質である。タンパク質の構造解析や機能解明は、病気の治療や創薬に直結するため、詳細なタンパク質の立体構造決定が不可欠である。タンパク質の3次元構造解析には、現在主にX線結晶構造解析と核磁気共鳴スペクトル（NMR）の2つの方法がある。NMRは溶液状態での解析が可能であるが、分子量が3万程度以上のタンパク質に関してはX線結晶構造解析が唯一の手段となる。X線結晶構造解析では、タンパク質結晶の品質で最終的に得られる結晶構造の精度が決まるため、高品質な結晶が必要である。また、中性子線構造解析ではX線構造解析では特定できない水素原子位置が分かる。X線構造解析では0.1mm以下の結晶でも測定がおこなえるが、中性子線構造解析では1mm以上の大さな結晶が必要である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

溶液から結晶を析出させるためには、溶媒蒸発や温度変化などにより過飽和度を高くする必要がある。しかし、タンパク質のように分子量が大きい物質は、過飽和度を極めて高くしないと結晶化しない。これは準安定領域が大きいこと、つまり臨界核半径が大きいことに起因する。また、極めて高い過飽和度の溶液では、一度結晶化が始まると、結晶の急成長や結晶核の大量生成のため、結晶品質に問題が生じる場合や多結晶化の問題が生じる恐れがある。自然核成長の結晶育成において、結晶の析出数を制御、つまり析出数を抑制することができれば、結晶の高品質化や大型化につながる。

【0004】

結晶成長を制御するためには、育成溶液の状態を可能な限り均一にすることが望まれる。例えば、種結晶育成における濃度分布は、部分的な高過飽和を生むため、2次核（雑晶）の発生を引き起こしたり、結晶品質の低下につながる要因と

なる。雑晶が発生すると、溶液の過飽和度が低下し、種結晶に十分な溶質を供給することができなくなり、成長が阻害される。また、雑晶の数や大きさが不確定なため、成長速度の制御が困難となる。さらに、種結晶に雑晶が付着して多結晶化する恐れがあるため、長期間の育成ができず、目的の大きさまで成長させることが難しい。効率よく品質の良い大きな結晶を育成するには、溶液濃度を均一に保ち、かつ、雑晶の発生を抑制する必要がある。そのため、一般的には結晶育成中に溶液の攪拌が行われる。溶液攪拌により濃度や温度を均一化することで過飽和度の制御が容易となり、高品質および大型結晶を育成するために、溶液攪拌が積極的に用いられてきた。また、溶液攪拌における流れのダイナミクスや結晶成長メカニズムなどの研究も盛んに行われている。

【0005】

一方、タンパク質の結晶育成においては、育成中は可能な限り静置させるのが一般的であり、溶液の対流を抑制することで品質の良い結晶が得られるとされてきた。究極的には、宇宙などの微小重力環境で対流を抑制し、結晶の高品質化および大型化が検討されてきた。つまり、これまでのタンパク質の結晶育成では、溶液攪拌は不必要とされてきた。溶液を攪拌するにあたり、最も重要なことは、①溶液に機械的な衝撃を与えないこと、②全体的に均一な攪拌を行うことなどが挙げられる。溶液への機械的な衝撃は核発生を引き起こし、不均一な攪拌は濃度分布を発生させるためである。さらにタンパク質の結晶育成においては、結晶が非常に軟らかく脆いため、攪拌による刺激や対流により結晶が崩れたり、変性したりするなどの弊害が生じる恐れがある。そのため、静置や対流を抑制する試みが積極的になったと考えられる。したがって、タンパク質の結晶育成においては、機械的な衝撃を極力抑えた攪拌が必要である。つまり、緩やかに溶液を攪拌しなければならないが、実際には難しい。さらに一般的には多くの結晶育成条件を同時に使うため、それぞれの溶液を同時に攪拌しなければならない。また、液量がマイクロリットル程度の少ない場合に対しても溶液を緩やかに攪拌しなければならない。

【0006】

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、従来は結晶化が困難であつ

た高分子の結晶を製造可能な製造方法の提供を、その目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために、本発明の高分子結晶の製造方法は、前記高分子溶液を入れた容器を運動させることにより前記高分子溶液を攪拌しながら前記高分子結晶を発生させ、これを成長させる製造方法である。

【0008】

このように、本発明の製造方法は、高分子溶液自身を直接攪拌するのではなく、それが入った容器を回転、振動、揺動等の運動をさせることにより、間接的に、前記高分子溶液を攪拌する。これによれば、簡単に穏やかな攪拌を実現でき、また、前記溶液の対流を自在に制御できるため結晶生成に適した攪拌を選択できる。この結果、従来は結晶化が難しかったタンパク質のような高分子であっても、結晶化が可能となる。

【0009】

【発明の実施の形態】

前記運動は、特に制限されず、回転、振動および揺動等があり、これらを2種類以上組み合わせた運動であってもよい。前記運動の程度も特に制限されず、高分子溶液の種類等に応じて適宜決定される。円運動の場合、例えば、10~1000 rpm、好ましくは30~200 rpm、より好ましくは50~100 rpmである。

【0010】

前記容器は、特に制限されず、例えば、ビーカ、シャーレ、複数のウエルを有するウエルプレート等が使用できる。

【0011】

高分子結晶の発生・成長は、例えば、前記高分子溶液を過飽和状態にすることにより、実施できる。過飽和状態は、例えば、前記高分子溶液中の溶媒を蒸発せねばよい。蒸発は、特に制限されず、自然蒸発、加熱による蒸発、減圧乾燥による蒸発、凍結乾燥による凍結等がある。この他に、前記高分子以外の成分が前記高分子溶液より高濃度で溶解したリザーバー溶液を入れた別の容器を準備し、この容器と前記高分子を入れた容器とにおいて、水蒸気が移動可能な状態にする

と、前記高分子溶液の蒸発が穏やかな条件で促進でき、特に、変性しやすいタンパク質等の生体高分子にとっては、好ましい。このような方法を、通常、蒸気拡散法という。

【0012】

本発明において、高分子結晶の成長の場は特に制限されない。通常、成長した結晶は、溶液より比重が重いため沈降し、容器底に移動する。このような方法を、通常、Sitting drop 法という。しかし、容器底で結晶が成長すると、ここに貼りついて回収に支障をきたす場合もある。そこで、前記容器に、前記高分子溶液よりも比重が重い液を入れ、前記比重が重い液と前記溶液との界面で結晶を成長させることが好ましい。このような方法は、通常、Floating-drop 法という。

【0013】

前記高分子は、特に制限されず、例えば、樹脂、タンパク質、糖類、脂質および核酸等がある。本発明の方法は、結晶化が特に困難なタンパク質等の生体高分子に適用することが好ましい。タンパク質としては、例えば、ニワトリ卵白リゾチーム、ヒトリゾチーム、グルコースイソメラーゼ、キシラーナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、リボヌクレアーゼなどが挙げられる。

【0014】

【実施例】

ニワトリ卵白リゾチームの結晶育成において、溶液攪拌を行った。タンパク質溶液は蒸留水50ml、酢酸ナトリウム三水和物0.467gの中に酢酸を加えpH4.5に調整した後、塩化ナトリウム1.25gおよび鶏卵白リゾチーム1.25gを追加したもの用いた。室温で調整した溶液を、100mlのテフロン(登録商標)容器に入れ、恒温水槽にて40℃で24時間保持し、完全に溶解させた。その後、25℃まで5時間で冷却し、穴径0.2μmのメンブランフィルタにて不純物を除去した。一方、リザーバー溶液は蒸留水50ml、酢酸ナトリウム三水和物0.467gの中に酢酸を加えpH4.5に調整した後、塩化ナトリウム3gを追加したもの用いた。

タンパク質溶液3μlおよび10μlに対して、リザーバー溶液を300μlとし、溶液攪拌の有無による違いを調べた。結晶化手法は、シッティングドロップ蒸気拡散法を用いた。また、フロリナート(前記タンパク質溶液も比重が重い液)を用

いた2液界面での結晶育成であるフローティングドロップ蒸気拡散法についても同時に実験を行った。フロリナート溶液量は $10\mu l$ である。結晶育成は20℃一定温度で行った。

攪拌機構はロータリー振盪器（タイテック製BR-15）を用いた。回転速度は、溶液が緩やかに攪拌される50 rpmに設定した。この攪拌装置の模式図を図1に示す。図示のように、振盪器2に、ウエルプレート1を載せて回転運動させて攪拌した。また、ウエルプレート1の各ウエルは、2つの小ウエルと1つの大ウエルとから構成されている。Floating-drop法を適用する小ウエルには、前記タンパク質溶液およびフロリナート1~4が入れてあり、Sitting-drop法を適用する小ウエルでは、前記タンパク質溶液1~2が入れられている。また、大ウエルでには、リゾチウム以外の成分が高濃度で溶解しているリザーバー溶液1~3が入れられている。この方法では1度にたくさんの溶液を簡便に攪拌することができる。

結晶の育成結果を図2に示す。溶液攪拌の有無で結晶析出数と結晶サイズに明らかな違いが生じた。図2 A、Bに示すように、溶液を攪拌しない従来法においては、非常に小さい結晶（微結晶）が数多く析出した。一方、図2 C、Dに示すように、溶液攪拌した育成では、結晶の析出数が少なく大きな結晶が得られた。また、溶液攪拌シッティングドロップ法（図2 C参照）に比べて、溶液攪拌フローティングドロップ法（図2 D）の方が結晶の析出がより少なく、結晶サイズも大きかった。

【0015】

【発明の効果】

以上のように本発明によれば、結晶化が困難な高分子であっても結晶化が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の一実施例に使用した攪拌装置の概略図である。

【図2】

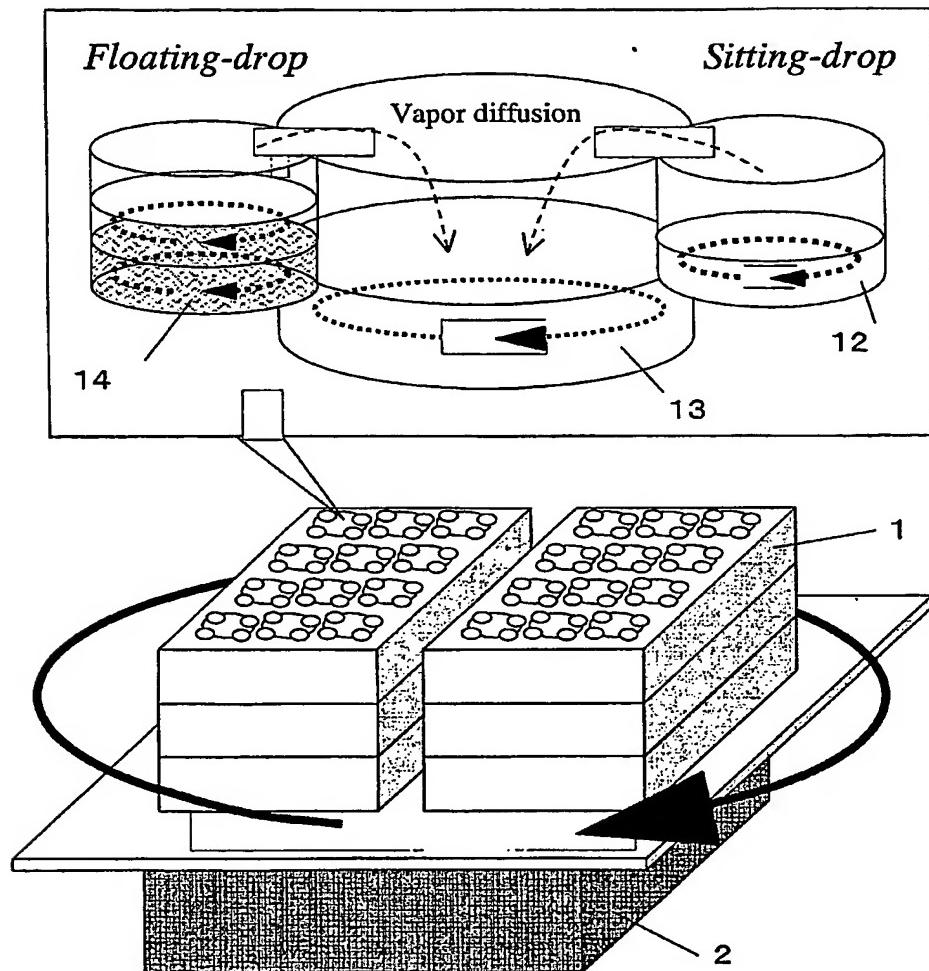
図2 A、Bは、従来法で得られた結晶を示す写真であり、図2 C、Dは、前記実施例で得られた結晶を示す写真である。

【符号の説明】

- 1 ウエルプレート
- 2 振盪器
- 1 2 タンパク質溶液
- 1 3 リザーバー溶液
- 1 4 フロリナート溶液

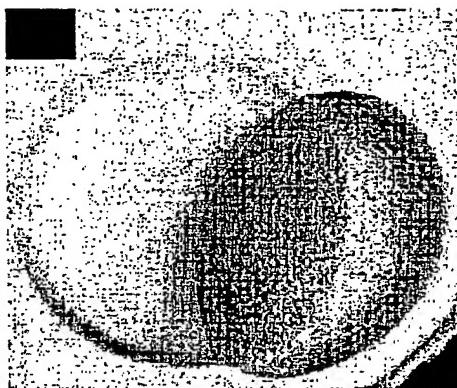
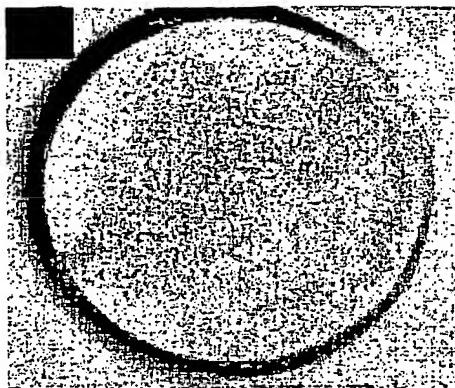
【書類名】 図面

【図 1】



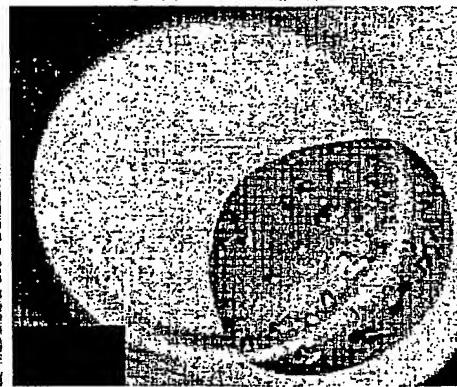
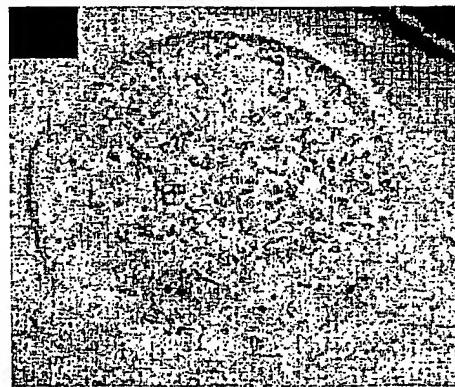
【図2】

A



B

C



D

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 結晶化が困難な高分子を結晶化できる方法を提供する。

【解決手段】 前記高分子溶液を入れた容器を運動させることにより前記高分子溶液を攪拌しながら前記高分子結晶を発生させ、これを成長させる。前記運動は、回転、振動および揺動のいずれであってもよく、若しくはこれらを2種類以上組み合わせた運動であってもよい。図1に示すように、振盪器2により、各ウェルにタンパク質溶液が入ったウエルプレートを円運動させて攪拌させてもよい。

【選択図】 図1

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 R7622

【提出日】 平成15年 3月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-382617

【承継人】

【識別番号】 592006224

【氏名又は名称】 佐々木 孝友

【承継人代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 4,200円

【その他】 同日付けの手続補足書で財団法人大阪産業振興機構から
佐々木孝友への譲渡証書を提出します。

【ブルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-382617
受付番号	50300388434
書類名	出願人名義変更届
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成15年 4月25日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	592006224
【住所又は居所】	大阪府吹田市山田西2丁目8番 A9-310号
【氏名又は名称】	佐々木 孝友
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	110000040
【住所又は居所】	大阪府大阪市北区天満橋1丁目8番30号 OA Pタワー26階
【氏名又は名称】	特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届
【整理番号】 R7622
【提出日】 平成15年 8月 8日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2002-382617
【承継人】
 【識別番号】 801000061
 【氏名又は名称】 財団法人大阪産業振興機構
【承継人代理人】
 【識別番号】 110000040
 【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
 【代表者】 池内 寛幸
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 139757
 【納付金額】 4,200円
【その他】 同日付の手続補足書で佐々木孝友から財団法人大阪産業振興機構
への譲渡証書を提出します。
【提出物件の目録】
【包括委任状番号】 0205128

特願 2002-382617

出願人履歴情報

識別番号 [801000061]

1. 変更年月日 2001年 9月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区本町橋2番5号 マイドームおおさか内
氏 名 財団法人大阪産業振興機構

特願2002-382617

出願人履歴情報

識別番号 [592006224]
1. 変更年月日 1991年12月 6日
[変更理由] 新規登録
住所 大阪府吹田市山田西2丁目8番 A9-310号
氏名 佐々木 孝友

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.